

Comportamiento inmunológico del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B como componente de una vacuna combinada DPTc-HB

✉ Mabel Izquierdo López,¹ Jorge Luis Vega,¹ María de los Ángeles Cortés,²
Néstor Expósito Raya,¹ Maribel Vega Simón,¹ Odenia Rodríguez,¹
Karelía Cosme,¹ Annette Pereira¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. AP 6162, La Habana, Cuba.
Telf.: (53-7) 21 0808; Fax: (53-7) 21 8070; E-mail: mabel.izquierdo@cigb.edu.cu

²Instituto Nacional de Higiene, Ciudad México, México.

RESUMEN

Se realizaron estudios físicoquímicos y biológicos sobre una vacuna combinada DPTc-HB durante un período de 36 meses, con el propósito de evaluar cada uno de sus componentes: el toxoide diftérico, el toxoide tetánico, antígenos de pertusis celular y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg). Para el componente hepatitis, se decidió evaluar los parámetros inmunogenicidad (potencia), inocuidad e identidad, así como determinar el por ciento de adsorción del antígeno sobre el adyuvante. Los resultados que se obtuvieron para el componente hepatitis B reflejaron que no se pierde la inmunogenicidad, con la obtención de valores de potencia relativa superiores a 0,5, y que el antígeno se puede identificar en la preparación por diferentes métodos analíticos.

Palabras claves: antígeno de superficie, HBsAg, hepatitis B, vacuna combinada

Biotecnología Aplicada 2000;17:112-114

ABSTRACT

Immunological Performance of the Hepatitis B Virus Surface Antigen as a Component of a DPTc-HB Combined Vaccine. Physicochemical and biological studies were carried out on a combined DPTc-HB vaccine for a period of 36 months, with the aim of evaluating each of its components: diphtheria and tetanus toxoids, cellular pertussis antigens, and hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). For the component hepatitis B, it was decided to evaluate immunogenicity, innocuity, and identity, as well as to determine the percent of adsorption of the antigen to the adjuvant. The values obtained for the hepatitis B vaccine component reflected that there is no loss of immunogenic power, with the obtainment of relative potency values higher than 0.5, and that the antigen can be identified in the preparation by different analytic methods.

Keywords: combined vaccine, HBsAg, hepatitis B, surface antigen

Introducción

El desarrollo de vacunas combinadas se ha convertido en un tema de gran expectativa para la prevención de diferentes enfermedades mediante la vacunación. El campo de la inmunología y la biología molecular, ofrecen grandes perspectivas en el desarrollo de nuevas vacunas. La disponibilidad de vacunas combinadas que contengan antígenos protectores contra diferentes enfermedades, cuya inclusión en el Programa Ampliado de Inmunización de la Organización Mundial de la Salud ha sido recomendada, puede simplificar estos programas y disminuir sus costos [1].

Este tipo de vacunas presenta ventajas potenciales como la reducción del costo de administración, la inmunización contra diferentes enfermedades y el aumento de la aceptación de los programas de inmunización por la población y el personal médico en general.

En la actualidad, existen diferentes variantes de vacunas combinadas, entre ellas DPT-Hib, Hib con componentes del meningococo A, B, C y la vacuna DPT-HB. Los requerimientos de control de calidad de las vacunas combinadas son similares a los requerimientos de la farmacopea para sus componentes individuales. Sin embargo, la interacción de estos componentes puede influir directamente en la reactogenicidad e inmunogenicidad de la vacuna y en las técnicas de control [2].

El objetivo de este trabajo es demostrar, en modelos animales (ratones), que no hay disminución de la respuesta de anticuerpos contra el componente HBsAg (antígeno de superficie del virus de la hepatitis B) de la vacuna, y demostrar la identidad e integridad de este componente durante el tiempo de almacenamiento.

Materiales y Métodos

Se estudiaron lotes de vacuna combinada DPTc-HB (10 µg HBsAg/0,5 mL de gel de hidróxido de aluminio), obtenidos de conjunto por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba, y el Instituto Nacional de Higiene de México. Estos lotes fueron almacenados a 4 °C durante 36 meses.

Material de referencia

Se empleó un lote de vacuna antihepatitis de origen recombinante, producido por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (VacHB-03-0395) y calibrado con la Preparación de Referencia Internacional (The International Reference for Hepatitis B Vaccine [plasma-derived], código 85/65), que fue suministrada por la Organización Mundial de la Salud. La potencia asignada con respecto a la Preparación de Referencia Internacional es igual o mayor que 1.

1. André FE. Development of combined vaccines: manufacturers' viewpoint. *Biologicals* 1994;22:317-21.

2. Corbel MJ. Control testing of combined vaccines: a consideration of potential problems and approaches. *Biologicals* 1994;22:353-60.

Prueba de potencia para la vacuna recombinante antihepatitis B

La prueba de potencia se realiza según los requerimientos técnicos de la Organización Mundial de la Salud [3]. Se inoculó un grupo de 10 ratones por la vía intraperitoneal con diferentes dosis de la vacuna (1,25; 0,312; 0,078; 0,039; 0,019 µg/mL). Veintiocho días después, los ratones fueron desangrados por la vía retroorbital y se evaluó la respuesta de anticuerpos antiHBsAg mediante un sistema ELISA para la determinación de anticuerpos. Se utilizaron placas de ELISA (Polysorp, Nunc, Dinamarca) que se recubrieron con HBsAg (fase sólida), la muestra se incubó en los pocillos de la placa y posteriormente se añadió HBsAg conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma, E.U.A.). Si la muestra contiene anti-HBs el HBsAg marcado se une al complejo HBsAg/antiHBs. Para el revelado de la reacción, se empleó *o*-fenilendiamina como sustrato cromogénico. La placa de ELISA se leyó a 492 nm [4].

De forma paralela, se ensayó la vacuna de referencia y la potencia relativa se expresó en función de ésta. El ensayo debe cumplir con los requisitos de linealidad y paralelismo, y la potencia relativa de la vacuna en estudio debe ser igual o mayor que 0,5. Este valor se acepta como criterio de pérdida del poder inmunogénico.

Comparación de potencia entre lotes de vacuna combinada y el lote de vacuna antihepatitis B que le dio origen. Se evaluaron cuatro lotes de vacuna combinada DPTc-HB (A, B, C, D) de forma paralela con la vacuna antihepatitis B que le dio origen (9307, 42400, 9319). Se comparó la respuesta de anticuerpos contra el componente hepatitis B de la vacuna combinada con la respuesta de anticuerpos antiHBsAg de la vacuna antihepatitis B.

Comportamiento en el tiempo de la potencia inmunogénica. Se estudió la potencia inmunogénica de lotes de la vacuna combinada DPTc-HB (A, B, C, D, E) durante 36 meses a 4 °C y se expresó en función de la preparación de referencia internacional.

Análisis estadístico para el cálculo de la potencia relativa

Se empleó el método probitt para el cálculo de los valores de dosis efectiva al 50% (DE_{50}), es decir, los valores de seroconversión de 50% de los animales. Para el cálculo de la potencia relativa se realizó un ensayo de líneas paralelas de pendiente común. El análisis estadístico incluyó modelos para evaluar las desviaciones de la linealidad y el paralelismo [5].

Determinación del por ciento de adsorción del antígeno sobre el adyuvante

Se realizó un ensayo ELISA para la cuantificación del HBsAg [6]. La placa (Maxisorp, Nunc, Dinamarca) se sensibilizó con un anticuerpo policlonal anti-HBsAg obtenido de plasma de carnero (fase sólida), se aplicó la muestra (si es positiva, los HBsAg se unen a la fase sólida) y posteriormente se añadió un anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma, E.U.A.). Se empleó *o*-fenilendiamina como sustrato cromogénico de la reacción. Los valores de absorbancia a 492 nm se determinaron en un lector de ELISA (Titertek Multiskan PLUS, Labsystem, Finlandia).

La vacuna se centrifugó a 2 000 rpm (HITACHI SCT-15B, Tokio, Japón) durante 15 min y se evaluó el contenido de HBsAg en el sobrenadante. El por ciento de adsorción se calculó mediante la fórmula que se describe a continuación, teniendo en cuenta el contenido total de antígeno unido al adyuvante y el contenido de antígeno detectado en el sobrenadante [7]. Para que el producto sea aceptado, el por ciento de adsorción del antígeno debe ser igual a 95% o mayor.

$$\% \text{ de adsorción} = \frac{100 - 100 \times \text{Concentración de HBsAg en el sobrenadante (ng/mL)}}{\text{dosis de vacuna (ng/mL)}}$$

Identificación del HBsAg en la vacuna

Se evaluaron dos lotes de vacuna combinada (lote A y lote B) y el lote respectivo de vacuna antihepatitis B recombinante empleado en la formulación. En una primera etapa, se realizó la identificación del HBsAg mediante Western blot después de haber separado el antígeno del gel de hidróxido de aluminio con el uso de tampón fosfato 0,4 M y tampón de tratamiento de muestra, que contiene beta-mercaptoetanol y SDS [7]. La concentración de ensayo del antígeno para la muestra y el control fue de 20 µg/mL. La banda de HBsAg se identificó en una electroforesis bajo condiciones reductoras y luego se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm (Schleicher & Schuell, Alemania). Para la identificación del HBsAg, se empleó un anticuerpo monoclonal anti-HBsAg y como sustrato cromogénico la diaminobenzidina (DAB). La banda de antígeno se identificó a la altura de 24 kD.

El criterio de aprobación del ensayo es la identificación visual del HBsAg

Sistema ELISA para la cuantificación del HBsAg como criterio de identificación. Se realizó un ensayo ELISA para la cuantificación del HBsAg [6]. La vacuna y el material de referencia se diluyeron en tampón fosfato salino que contenía seroalbúmina bovina 0,2%, para obtener cuatro concentraciones de HBsAg (0,4; 0,2; 0,1; 0,08 µg/mL). Las muestras y el material de referencia se ensayaron por triplicado y se empleó como control negativo el diluyente de muestra. Como criterio de identificación del antígeno se empleó el valor de corte de la placa (valor promedio de los controles multiplicado por 1,3); la muestra de vacuna debe presentar valores de densidad óptica iguales o superiores al valor de corte de la placa.

Resultados y Discusión

Comportamiento de la potencia inmunogénica de los diferentes lotes de vacuna

Los resultados obtenidos de la comparación de las vacunas combinadas con la vacuna recombinante antihepatitis B, reflejan —a partir de los estudios de potencia relativa— que el componente hepatitis B cumple con las especificaciones de la técnica (potencia relativa $\geq 0,5$) para poder ser empleado en la formulación de la vacuna combinada, los valores de potencia relativa para las combinaciones se encuentran por encima del límite de especificación (Tabla 1).

El estudio realizado para la evaluación de la potencia inmunogénica de los lotes de vacuna combinada (A, B,

3. Technical Report Series 786, World Health Organization, Geneva 1989.

4. Izquierdo M, Ramírez V, Peña M, González Griego A, Muzio V, Pentón E, et al. Inmunorespuesta para la vacuna recombinante contra la hepatitis B derivada de levadura. *Biología Aplicada* 1993; 10(2):103.

5. Finney DJ. Statistical methods in biological assay. 3rd edition. London: Griffing and Co, Ltd; 1978.

6. González Griego A, Alerm A, Vega I, Ramírez V, Salgado A, Vingut JL, et al. Cuantificación del antígeno de superficie del VHB (HBsAg) en muestras biológicas con fines asistenciales y preparativos. *Biología Aplicada* 1993; 10(2):104.

7. Izquierdo M, Rodríguez O, Santiago A, Pineda J, Pozo C, Gutiérrez D, et al. Método para la comprobación de adsorción y desadsorción de la vacuna contra la hepatitis B. *Biología Aplicada* 1993; 10(2):105.

C, D, E) —por un periodo de 26 meses para los lotes A, B, C— (Tabla 2), refleja que el poder inmunogénico de los diferentes lotes de vacunas combinadas no se afecta con el tiempo, y que los valores de potencia relativa de los lotes se mantienen por encima de 0,5.

En la Tabla 1, se observa que los valores de potencia relativa de las vacunas combinadas para los tres lotes del estudio (A, B, D) son mayores que los valores obtenidos para el componente hepatitis que les dio origen, lo que sugiere que la mezcla HBsAg con otros antígenos (toxóide diftérico, pertusis y toxóide tetánico) pudiera potenciar la respuesta de anticuerpos anti-HBsAg.

En la Tabla 2, se observa que hay variabilidad dentro de los mismos lotes de vacuna combinada; por ejemplo, el lote A comienza con una potencia relativa de 5,5, en los tiempos intermedios disminuye y posteriormente aumenta a 5,22 en el periodo de 26-36 meses. Por otro lado, en el lote B hay un aumento de la potencia relativa en los periodos 0-6 y 19-25 meses, y para el lote E sucede algo similar al lote A. La variabilidad de los valores de potencia relativa puede estar dada por la propia variabilidad del ensayo. Estos ensayos son altamente variables y se obtienen resultados pocos reproducibles dentro del mismo laboratorio [8-10], por lo que se realizó un procesamiento estadístico riguroso y el límite de aceptación se estableció de acuerdo con la variabilidad del ensayo (coeficientes de variación superiores a 50%). Para evaluar la potenciación de la respuesta contra el componente hepatitis en la vacuna combinada, se debe estudiar un número mayor de lotes.

En los estudios realizados, quedó definido que el componente hepatitis no sufre ninguna alteración de su respuesta de anticuerpos en el periodo ensayado, lo que indica que la potencia inmunogénica no se afecta por la acción de otros componentes del preparado vacunal.

Comportamiento del por ciento de adsorción del HBsAg

El HBsAg se mantiene adsorbido sobre las partículas del gel de hidróxido de aluminio (Tabla 3) durante su almacenamiento, con un por ciento de adsorción superior a 99%. La imposibilidad de detectar cantidades significativas (por ciento de adsorción igual o superior a 95%) de antígeno libre en el sobrenadante de la vacuna en el tiempo, da una medida de la estabilidad de la formulación para el componente HBsAg que permanece adsorbido sobre el gel de hidróxido de aluminio.

Identificación del HBsAg por la técnicas Western blot y ELISA

El HBsAg se identificó dentro de la preparación mediante Western blot hasta el periodo de 19-25 meses para los lotes A y B, y se observó una banda 24 kD correspondiente al HBsAg y que no había productos de degradación en los lotes (Figura). La búsqueda de una técnica alternativa al Western blot para la identificación del HBsAg, se debe a las siguientes razones: a) la técnica de Western blot no permite evaluar pequeñas cantidades de muestra en la preparación y, por lo tanto, es menos sensible que el sistema ELISA; b) por su sensibilidad, el sistema ELISA permite identificar el antígeno durante largos periodos (36 meses) y detectar sus cambios estructurales. Sobre la base de que el poder inmunogénico del HBsAg se debe a su carácter particulado, este sistema ELISA puede detectar si hay pérdida o no de su conformación en el tiempo.

Recibido en junio de 1999. Aprobado en febrero del 2000.

Tabla 1. Comparación de los lotes de vacunas combinadas con los lotes de hepatitis que le dieron origen.

Lotes de vacunas combinadas	Potencia relativa de las vacunas combinadas	Lotes de vacuna hepatitis	Potencia relativa de las vacuna hepatitis
Lote A	5,5	9307	2,40
Lote B	3,43	9307	2,40
Lote C	0,85	42400	1,26
Lote D	2,94	9319	1,33

Tabla 2. Comportamiento de la potencia inmunogénica en los diferentes lotes de vacuna.

Lotes	Tiempo (meses)				
	0-6	7-12	13-18	19-25	26-36
Lote A	5,5	1,51	ND	1,58	5,22
Lote B	3,43	0,85	ND	2,61	2,99
Lote C	2,43	ND	5,5	ND	3,16
Lote D	ND	4,51	1,46	1,58	-
Lote E	ND	2,94	1,74	2,13	-

ND: no determinado.

Tabla 3. Comportamiento del por ciento de adsorción del antígeno al adyuvante.

Lotes	Tiempo (meses)				
	0-6	7-12	13-18	19-25	26-36
Lote A	> 99	> 99	ND	> 99	> 99
Lote B	> 99	ND	> 99	> 99	> 99
Lote C	> 99	> 99	ND	> 99	> 99
Lote D	ND	> 99	ND	ND	> 99
Lote E	ND	> 99	ND	ND	> 99

ND: no determinado.

Tabla 4. Identificación del HBsAg mediante Western blot y ELISA.

Lotes	Tiempo (meses)				
	0-6	7-12	13-18	19-25	26-36
Lote A	iden.	iden.	ND	iden.	iden. (*)
Lote B	iden.	ND	iden.	iden.	iden. (*)
Lote C	iden.	iden.	ND	iden.	iden. (*)
Lote D	ND	iden.	ND	ND	iden. (*)
Lote E	ND	iden.	ND	ND	iden. (*)

iden.: identificado; iden. (*): identificado por ELISA; ND: no determinado.

En la Tabla 4, se observa la identificación del HBsAg en la preparación de los cinco lotes de vacuna combinada que se estudiaron por 26-36 meses. El hecho de que se demuestre la presencia del HBsAg en la preparación vacunal por métodos de detección específica del antígeno, permite estudiar los cambios físicoquímicos que se producen en la preparación y que pudieran afectar la respuesta inmunológica.

En la vacuna combinada, el componente hepatitis B es el de menor peso molecular (24 kD) comparado con los componentes toxóide diftérico, antígenos de pertusis celular y toxóide tetánico. Estos últimos componentes tienen un grado de pureza bajo, por lo que hay restos de células en la preparación y el HBsAg puede estar expuesto a la acción de proteasas. Por esta razón, es de vital importancia demostrar la integridad del HBsAg en la preparación.



Figura. Western blot anti-HBs para la identificación del HBsAg en la vacuna. Carrilera 1, vacuna combinada lote A (20 µg); carrilera 2, control de la vacuna antihepatitis B de los lotes A y B (20 µg); carrilera 3, vacuna combinada lote B (20 µg); carrilera 4, material de referencia VachB-030395 (20 µg).

8. The United Pharmacopoeia. Design and analysis of biological assays. USP 1995; 23:1705.

9. Ferguson M, Heath A, Minor PD. Collaborative study. Report of a collaborative study for assessing the potency of hepatitis B vaccine. Biologicals 1990;18:345-50.

10. WHO/VS/97.02. A WHO guide to good manufacture practice (GMP) requirements. Part 2: Validation; 1997.